

## II. 原 著

### II. 5 慢性重症下肢虚血患者を対象とした自家末梢血 CD34 陽性細胞移植による 下肢血管再生治療における G-CSF を用いない末梢血幹細胞採取の経験

先端医療センター 細胞管理室 丸 山 京 子 小 林 利 英 子 橋 本 尚 子  
血管再生科 藤 田 靖 之 川 本 篤 彦

#### 要 旨

末梢血幹細胞採取 (PBSCH) は、血液悪性腫瘍の治療として行う場合、大量の幹細胞を必要とするため、G-CSF などのサイトカイン投与により骨髄中の幹細胞を末梢に動員した後ハーベストする。今回我々は、血管再生治療を行うため、G-CSF (-) PBSCH を 3 例 6 回にわたって施行し、幹細胞採取率について検討をおこなった。その結果、平均 11.7L の血液処理を行って、有核細胞  $1.53 \times 10^8 \pm 0.46 \times 10^8/\text{kg}$ 、CD34 陽性細胞  $9.01 \times 10^4 \pm 6.24 \times 10^4/\text{kg}$  を採取した。これらは、同じ血管再生プロジェクトにおいて行った G-CSF 動員採取における細胞数に比べ、有核細胞数では 2 分の 1、CD34 陽性細胞では約 20 分の 1 の収率であった。G-CSF の合併症が問題となる症例において、大量の幹細胞を必要としない再生治療では G-CSF を用いない採取法が有用となる可能性があった。

[キーワード]

末梢血幹細胞採取、G-CSF、再生医療

(神戸市立病院紀要 51 : 47 - 50, 2012)

#### Peripheral blood stem cell harvest (PBSCH) without G-CSF mobilization for the vascular regeneration therapy in ischemic limb disease

Kyoko Maruyama<sup>1)</sup>, Rieko Kobayashi<sup>1)</sup>, Yasuyuki Fujita<sup>2)</sup>,  
Atsuhiko Kawamoto<sup>2)</sup>, Hisako Hashimoto<sup>1)</sup>

Division of Cell Processing Center, Institute of Biomedical Research and Innovation<sup>1)</sup>

Division of Vascular Regeneration, Institute of Biomedical Research and Innovation Hospital<sup>2)</sup>

#### Abstract

The purpose of this article was to evaluate the efficiency of peripheral blood stem cell collection without G-CSF mobilization to avoid G-CSF related risks. We carried out G-CSF(-) PBSCH in 3 patients with chronic ischemic limb disease for two times each. The number of separated mononuclear cells by blood processing volume of an average of 11.7L were  $1.53 \times 10^8 \pm 0.46 \times 10^8/\text{kg}$  containing  $9.01 \times 10^4 \pm 6.24 \times 10^4/\text{kg}$  CD34-positive cells. These numbers of cells were approximately a half in MNC and a one-20<sup>th</sup> in CD34+ cells of G-CSF mobilizing PBSCH in the patients with the same therapeutic angiogenesis projects. In the regenerative medicine, small amount of CD34+cells are reported to be still effective, our results suggest the utility of the method of PBSCH without G-CSF, especially in the case that complications are concerned about.

[Keywords]

PBSCH, G-CSF, Regenerative medicine

(Kobe City Hosp Bull 51 : 47 - 50, 2012)

#### はじめに

近年、骨髄由来の幹細胞が血液細胞ばかりでなく、血管、神経系、肝、骨、乳腺、腸管、肺、心筋など種々

の臓器を構成する細胞へ分化する能力があることが証明され<sup>1)-6)</sup>、傷害を受けた臓器を自己の骨髄由来幹細胞で修復しようとする再生医療の臨床研究がおこな

われるようになってきた。当センターでも開設以来、自己骨髄由来幹細胞を用いた、血管再生、骨再生、脳梗塞再生の医師主導型臨床治験が行われ、間もなく肝細胞の再生医療も開始する予定となっている。これらの臨床研究において、自己幹細胞の採取は、骨髄あるいは末梢血から採取分離が行われている。骨髄からの採取は通常全身麻酔が必要であり、これらの臓器障害を発症した患者にとってはリスクの高いことが多く、比較的安全に採取できる末梢血幹細胞採取がしばしば用いられる。通常の血液悪性疾患に対する末梢血幹細胞移植などでは、大量の CD34 陽性細胞を必要とすることから、G-CSF などのサイトカインを投与して、骨髄から末梢へ CD34 陽性細胞を動員した後にハーベストを行う。しかしながら G-CSF 投与に関連する、血栓、脾破裂などのリスクは血管障害などの患者においては、看過できない場合もあり、できるだけ安全な幹細胞採取法の確立が求められている。今回我々は、慢性下肢虚血患者において G-CSF なしに末梢血幹細胞採取を行った。これまで、幹細胞採取において、サイトカイン等による CD34 陽性細胞の動員なしにハーベストした報告はほとんどない。傷害局所に直接注入するなどのため、比較的細胞数が少なくてもよい場合は、この方法でも十分に細胞数が得られる可能性があり、今回の採取結果を、G-CSF 投与群と比較して報告する。

#### I. 症例

2009 年から 2012 年 6 月までに、当センターで自己末梢血血管内皮前駆細胞移植による血管再生治療の臨床治験に参加した G-CSF 投与群 6 例、G-CSF 非投与群 3 例を対象とした。

#### II. 方法

1. G-CSF 投与群；G-CSF を  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  を 5 日間連続で皮下注射し、5 日目に大腿静脈からアクセスシアフエーシスを行った。血球増加に伴う合併症予防のため、WBC  $75000/\mu\text{L}$  を超えた場合は G-CSF 投与は行わず、直ちにアフエーシスを行った。
2. G-CSF 非投与群；適格性を確認後、同様に大腿静脈からアフエーシスを行った。各々の患者について 2 週間間隔で 2 回の採取を行った。

いずれも血球分離装置 AS. TEC204; (Fresenius HemoCare, Bad Homburg, Germany) を使い、PBSCH のプログラムに従い、20～24 サイクル、10L～12L の血液を処理し 110ml～120ml の単核

球濃縮液を採取した。

3. 採取した細胞は直ちに自動血球測定装置で有核細胞数を、ISHAGE 法で CD34 陽性細胞絶対数を計測した。

#### III. 結果 (Table 1, 2)

G-CSF 投与群 6 例 (M:F = 2:4) の年齢は中央値 41.5 歳 (28 歳～68 歳) 平均体重  $70.43\text{kg} \pm 8.56\text{kg}$ 、G-CSF 非投与群は 3 例 (M:F = 2:1)、年齢中央値 38 歳 (28 歳～44 歳) 平均体重  $59.18\text{kg} \pm 8.33\text{kg}$  であった。

G-CSF 投与群はそれぞれ 5 日間の G-CSF 投与後 1 回のみハーベストした。G-CSF 非投与群は 2 週間の間隔をおいて 2 回のハーベストを行った。いずれの群でも G-CSF 投与による軽度の肝機能障害 3 例、発熱 2 例、腰痛 3 例を認めたが、Grade II 以上の有害事象は発生しなかった。採取単核球数は G-CSF 投与群で  $2.91 \times 10^{10} \pm 1.03 \times 10^{10}$  ( $4.10 \times 10^8 \pm 1.22 \times 10^8/\text{kg}$ )、G-CSF 非投与群で  $9.35 \times 10^9 \pm 3.70 \times 10^9$  ( $1.53 \times 10^8 \pm 0.46 \times 10^8/\text{kg}$ )、CD34 陽性細胞数は G-CSF (+)  $1.32 \times 10^8 \pm 1.90 \times 10^8$  ( $1.72 \times 10^6 \pm 2.39 \times 10^6/\text{kg}$ )、G-CSF (-)  $5.68 \times 10^6 \pm 4.02 \times 10^6$  ( $9.02 \times 10^4 \pm 6.24 \times 10^4/\text{kg}$ ) であった。G-CSF (-) の有核細胞数は 2 回～3 回の採取で、ほぼ G-CSF (+) の 1 回分に匹敵した。特に年齢の若い症例では 1 回で  $1 \times 10^{10}$  個以上の採取ができた。しかし CD34 陽性細胞については、G-CSF (-) では末梢血中の割合が極めて少ないため、1 回の採取量は G-CSF (+) の約 20 分の 1 であった。

#### IV. 考察

骨髄由来の幹細胞 (CD34 陽性細胞) はこれまで主に血液悪性腫瘍の移植治療に、造血幹細胞としての目的で用いられてきた。血液幹細胞ソースとしての、骨髄由来幹細胞は、一般的に有核細胞として  $1 \times 10^{10}$  個、CD34 陽性細胞として  $1 \times 10^8$  個程度必要である。幹細胞は通常、骨髄、もしくは末梢血から分離採取されるが、末梢血からの分離の場合、末梢血中の幹細胞が極めて少数であるため、G-CSF などのサイトカインによって末梢へ CD34 陽性細胞を動員した後に血液成分採取装置で採取され、その手法、採取効率などはほぼ確立されている。一方、近年この幹細胞には多能性幹細胞としての分化増殖能力があること、血液細胞だけではなく、血管内皮細胞、乳腺細胞、肝細胞、神経細胞などの修復に関与することが報告されており<sup>1)</sup>、成人骨髄由来幹細胞を用いた再生医療が臨床試験として

行われている。これらの再生医療においては、必要とされる細胞の種類、細胞数、投与経路などは様々で、至適な採取法なども十分に解明されていない。これまでは、比較的必要な細胞数が少ないであろう、局所への投与においても、末梢から幹細胞を採取する場合はG-CSFによる動員を行ってきた。しかし、G-CSFは、血栓症、望ましくないサイトカインの誘導、脾破裂などを引き起こす場合があり、再生医療を必要とする臓器障害患者においては、高リスクとなる。そこで、G-CSF等を用いず、また、骨髓採取のように全身麻酔を必要とする手技を行わず、安全かつ必要量の細胞を採取するためには、G-CSF投与なしでの末梢血幹細胞採取のデータが重要となる。今回我々はG-CSFなしでの末梢血幹細胞採取を3例6回にわたって行った結果、有核細胞数として平均  $9.35 \times 10^9$  個 ( $0.4 \sim 1.2 \times 10^{10}$ ) :  $1.53 \times 10^8$ /kg、CD34陽性細胞として平均  $5.68 \times 10^6$  個 ( $0.75 \sim 9.85 \times 10^6$ ) :  $9.01 \times 10^4$ /kgを採取することができた。これは、通常の血液患者から、あるいは慢性重症下肢虚血患者からのG-CSF動員PBSCHと比較して有核細胞数としては2分の1程度、CD34陽性細胞としては20分の1程度であった。予想通り、末梢血中のCD34陽性細胞の割合が極めて低いため、G-CSF(-)CD34陽性細胞採取数は極めて少ない。しかし、血液悪性腫瘍における場合、細

胞は末梢静脈から投与され、その90%以上が目的である骨髓にたどり着く前に、肺や、脾網内系でトラップされ、実際には極めて少ない細胞のみで、新たな血液細胞の再構築が行われる。臓器障害での再生医療では、直接傷害された局所に細胞を注入することによって、少ない有核細胞、CD34陽性細胞でも十分に、臓器の再生をはかれる可能性がある。川本らは<sup>7)</sup>、 $1 \times 10^5$ /kgの投与量でも、直接虚血を起こした筋肉部位に注射することによって、 $1 \times 10^6$ /kgの投与と同等の血管の再生が見られたと報告している。また、肝硬変に対する細胞療法としても坂井田ら<sup>8)</sup>は  $5.2 \times 10^9$  個の骨髓有核細胞を末梢から投与して、効果があったと報告している。これらの細胞数はG-CSF(-)の採取でも得られる数であることが、今回我々が行った臨床研究で明らかとなった。しかし、骨髓由来幹細胞にはHSC (hematopoietic stem cell), EPC (Endothelial progenitor cell), MSC (Mesenchymal stem cell), など種々のprogenitor細胞が含まれており、これらのいずれが重要かについては、その臓器修復再生の機序とともに十分には解明できておらず、G-CSFあるなしによる細胞数の違いだけでなく、ふくまれるprogenitor細胞の性質等も慎重に検討していく必要があると考えられた。

Table.1

The result of peripheral blood stem cell apheresis with G-CSF mobilization.

Case	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	AV ± S.D.
age(y) / sex	28 / M	65 / F	39 / F	42 / F	68 / F	50 / M	48.67 ± 15.54
BW (Kg)	79	55.2	78.2	67.5	74.8	69.9	70.43 ± 8.56
apheresis volume (L)	11	12	11	11.5	11.5	10	11.17 ± 0.68
total WBC cells	4.62E+10	2.02E+10	2.60E+10	3.61E+10	2.66E+10	1.92E+10	2.91E+10 ± 1.03E+10
total CD34+cells	5.02E+08	8.66E+06	1.58E+08	8.06E+07	1.45E+07	2.54E+07	1.32E+08 ± 1.90E+08
WBC/Kg	5.85E+08	3.68E+08	3.41E+08	5.35E+08	3.56E+08	2.75E+08	4.10E+08 ± 1.22E+08
CD34/Kg	6.35E+06	1.57E+05	2.07E+06	1.19E+06	1.94E+05	3.63E+05	1.72E+06 ± 2.39E+06
CD34/CD45 (%)	1.11	0.04	0.65	0.23	0.06	0.13	0.37 ± 0.43

Table.2

The result of peripheral blood stem cell apheresis without G-CSF mobilization.

Case	No.1		No.2		No.3		AV ± S.D.
age(y) / sex	28 / M		44 / F		38 / M		36.67 ± 8.08
BW (Kg)	61.5		49		67.2		59.18 ± 8.33
	#1	#2	#1	#2	#1	#2	
apheresis volume (L)	12.5	10.75	12.5	12.5	11	11	11.71 ± 0.87
total WBC cells	1.26E+10	9.72E+09	4.50E+09	5.05E+09	1.24E+10	1.18E+10	9.35E+09 ± 3.70E+09
total CD34+cells	9.85E+06	8.13E+06	7.51E+05	7.64E+05	8.68E+06	5.89E+06	5.68E+06 ± 4.02E+06
WBC/Kg	2.07E+08	1.57E+08	9.15E+07	1.04E+08	1.85E+08	1.76E+08	1.53E+08 ± 4.62E+07
CD34/Kg	1.61E+05	1.31E+05	1.53E+04	1.57E+04	1.29E+05	8.78E+04	9.01E+04 ± 6.24E+04
CD34/CD45 (%)	0.08	0.08	0.02	0.02	0.07	0.05	0.05 ± 0.03

## 文 献

- 1) Lengerke C, Daley GQ. Autologous blood cell therapies from pluripotent cells. *Blood Rev* 2010 ; 24 : 27-37.
- 2) Gilchrist ES, Plevris JN. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. *Liver Transpl* 2010 ; 16 : 118-129.
- 3) CV Borlongan. Bone marrow stem cell mobilization in stroke: a 'bonehead' may be good after all! *Leukemia* 2011 ; 25 : 1674-1686.
- 4) Nakamura T, Tsutsumi V, Torimura T, et al. Human peripheral blood CD34-positive cells enhance therapeutic regeneration of chronically injured liver in nude rats. *J Cell Physiol* 2012 ; 227 : 1538-1552.
- 5) Ii M, Horii M, Yokoyama A, et al. Synergistic effect of adipose-derived stem cell therapy and bone marrow progenitor recruitment in ischemic heart. *Lab Invest.* 2011 ; 91 : 539-552.
- 6) Shoji T, Ii M, Mifune Y, et al. Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. *Lab Invest.* 2010 ; 90 : 637-649.
- 7) Kawamoto A, Katayama M, Handa N, et al. Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells.* 2009 ; 27 : 2857-2864.
- 8) Takami T, Terai S, Sakaida I. Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discov Med.* 2012 ; 14 : 7-12.